

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17804

研究課題名(和文)ノルアドレナリン作動性内因性鎮痛の変化がデュロキセチン鎮痛へ及ぼす影響を調べる

研究課題名(英文)Changes in noradrenaline mediated endogenous analgesia affect duloxetine efficacy in neuropathic pain

研究代表者

伊東 幸日子 (ITO, Sachiko)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50614997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害モデルSNL(脊髄神経結紮)後2週と6週のラットを用い、デュロキセチンの鎮痛効果を実験で測定し、脊髄後角のノルアドレナリン、アセチルコリンの放出量をマイクロダイアライシスで測定した。さらに、ドーパミン脱水素酵素とアセチルコリン転移酵素をマーカーとする蛍光染色法を用いた免疫組織化学により、脊髄のノルアドレナリン/アセチルコリン作動性神経の活動の変化を比較した。また、DREADDシステムとオプトジェネティクスを利用し、ノルアドレナリン作動性神経系を人為的に制御した場合のデュロキセチンの鎮痛効果を調査した。今後はオピオイドやセロトニンの関与を念頭に、拮抗薬投与など薬理学検討を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では鎮痛薬が経時的に効きにくくなるラット動物モデルを用いて、そのメカニズムを詳細に検討した。特に我々がこれまでに検討を続けてきた、動物に元来備わっている内因性鎮痛システムとの関連に注目して検討した。

慢性痛患者では内因性鎮痛システムの機能が低下しているとの報告がある。いくつかの鎮痛薬はノルアドレナリンやアセチルコリンによる鎮痛システムを活性化し鎮痛を示すことが知られており、鎮痛薬が効きにくい状況ではこれらのシステムがどう変化しているのかについても検討した。今後、鎮痛薬が効きにくいグループに対する新規治療戦略につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We divided rats into 2 groups, 2weeks and 6weeks after Spinel nerve ligation (SNL) and tested antihyperalgesic effects of duloxetine, an SNRI. Using microdialysis systems, we evaluated the changes in the amount of noradrenaline and acetylcholine released in the lumbar spinal cord in each group.

Further, immunohistochemistry in the spinal cord revealed changes in neuronal activity of noradrenergic and cholinergic neurons between 2 groups.

Finally we tested the antihyperalgesic effects of duloxetine after modulating neuronal activity of noradrenergic and cholinergic neurons in the locus coeruleus (LC) by using optogenetic systems.

研究分野：麻酔神経科学

キーワード：デュロキセチン 神経障害疼痛 内因性鎮痛 マイクロダイアライシス ノルアドレナリン アセチルコリン オプトジェネティクス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経障害疼痛は長期にわたって患者を苦しめることも多く、社会的損失が大きい。抗うつ薬であるデュロキセチンがどのように神経障害疼痛を改善させるかについて、その機序を解明することは今後の神経障害疼痛の治療を進める上で非常に重要である。

### 2. 研究の目的

神経障害性疼痛による慢性痛は治療が困難なことが多く、QOL、ADL を大きく低下させる。鎮痛薬が効きにくいことが一つの原因であるが、その理由は未だ不明である。本研究では鎮痛薬が経時的に効きにくくなるラット動物モデルを用いて、そのメカニズムを詳細に検討することを目的とする。特に我々がこれまでに検討を続けてきた、動物に元来備わっている内因性鎮痛システムとの関連に注目して検討する。慢性痛患者では内因性鎮痛システムの機能が低下しているとの報告がある。いくつかの鎮痛薬はノルアドレナリンやアセチルコリンによる鎮痛システムを活性化し鎮痛を示すことが知られており、鎮痛薬が効きにくい状況ではこれらのシステムがどう変化しているのかについて検討する。また、内因性鎮痛システムを人為的に制御した場合、鎮痛薬に対する効果がどう変化するのか検討し、鎮痛薬が効きにくいグループに対する新規治療戦略としての可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

1. 神経障害後のデュロキセチンの鎮痛作用の確認: SNL (spinal nerve ligation) 後 2 週、6 週のラットを用いて、デュロキセチンを投与後の鎮痛効果がどのように変化するか確認する。鎮痛効果は測定部に現れる痛覚過敏を von Frey filament test と paw pressure test により判定する。2. デュロキセチン投与後のノルアドレナリン、アセチルコリン放出量: 脊髄後角組織内のノルアドレナリンとアセチルコリンをマイクロダイアライシスにより同時に測定し、SNL 作成後 2 週、6 週のラットで変化率を比較する。測定は HPLC-ECD により行う。各神経伝達物質の濃度変化を算出し、神経障害後の週数およびデュロキセチン投与量ごとに統計学的な検討を行う。さらには、ドーパミン脱水素酵素とアセチルコリン転移酵素をマーカーとする蛍光染色法を用いた免疫組織化学を行い、脊髄のノルアドレナリン作動性神経とアセチルコリン作動性神経の活動性が SNL 後 2 週と 6 週でどのように変化しているかも比較する。3. 人為的な内因性鎮痛機構の制御とデュロキセチン鎮痛の関連: DREADD システムとオプトジェネティクスを利用し、ノルアドレナリン作動性神経系を制御することでノルアドレナリンの特異的役割を解明する。ノルアドレナリン作動性神経細胞に Cre リコンビナーゼが発現する遺伝子組み換えラット (DbH-Cre ラット) に Cre 存在細胞でのみ DREADD や光感受性受容体を発現させるアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を使用する。これにより人工リガンドもしくは光刺激によるノルアドレナリン神経のみの興奮・抑制制御が可能である。神経軸索末端から感染し、逆行性に細胞体へ輸送される逆行性 AAV ベクターを使用することで感覚制御に関与するノルアドレナリン細胞のみをターゲットとする。最初に、人工リガンド (クロザピン-N-オキシド: CNO) 投与によって痛み閾値が変化するのか検討する。その後 CNO とデュロキセチンを同時投与し、単独の場合と鎮痛効果がどのように変化するのか検討する。この検討は興奮性の受容体を発現する AAV と抑制性の受容体を発現する AAV いずれも使用し、ノルアドレナリン作動性神経のデュロキセチン鎮痛における役割を検討する。ノルアドレナリンを調節した状態で鎮痛も見られるようであれば、オピオイドやセロトニンなどの関与を念頭に、拮抗薬投与など薬理的にも検討する。また、CNO 単独あるいはデュロキセチンと同時投与した場合の脊髄のノルアドレナリンの放出量およびアセチルコリンの放出量についてマイクロダイアライシスにより測定する。ノルアドレナリンの放出を人為的に増減させることで、アセチルコリンがどう変化するのか検討する。

### 4. 研究成果

神経障害モデル SNL (脊髄神経結紮) 後 2 週と 6 週のラットを用い、デュロキセチンの鎮痛効果を行動実験で測定し、脊髄後角のノルアドレナリン、アセチルコリンの放出量をマイクロダイアライシスで測定した。さらに、ドーパミン 脱水素酵素とアセチルコリン転移酵素をマーカーとする蛍光染色法を用いた免疫組織化学により、脊髄のノルアドレナリン/アセチルコリン作動性神経の活動の変化を比較した。また、DREADD システムとオプトジェネティクスを利用し、ノルアドレナリン作動性神経

系を人為的に制御した場合のデュロキセチンの鎮痛効果を調査した。今後はオピオイドやセロトニンの関与を念頭に、拮抗薬投与など薬理学検討を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------